SDS-PAGE(2) - Troubleshooting

(주)다인바이오 연구소

1. Gel 조제가 어렵다.

• 전기영동이 잘되고, 깨끗한 데이터를 얻을 수 있는 가장 좋은 요령은 깨끗한 gel을 제작하는 것이며, 얼룩이 없는 gel을 제작하려면 다음과 같은 사항에 주의해야 한다.

• 첫째로, 깨끗한 유리 plate와 comb을 사용한다. 더러워져 있으면 gel화 되기가 어렵다.

• Gel 용액은 조심스럽게 충분히 섞어야 한다. 균일한 용액이 아니면 균일한 gel을 만들 수 없고, 장시간 또는 지나치게 섞어주게 되면 공기 중의 산소가 용해되어(산소는 gel화 저해) gel화가 어렵다. 방법에 따라서는 용액을 탈기시키는 경우도 있다(Isoelectric 전기영동 gel은 제외). 또한 acrylamide와 bisacrylamide의 농도와 비율이 적합하지 않을 경우에는 gel이 마치 점액질 같이 강도가 낮아진다.

• Gel이 전혀 굳지 않는 현상은 APS가 만들어진지 오래된 경우 나타날 수 있는 전형적인 경우로, APS를 새로 만들어 사용한다.

• 또 4℃에서 꺼낸 시약을 즉시 사용하거나 주입하게 되면 온도에 의해 얼룩이 생길 수 있다. 이는 gel화가 온도에 의해 영향을 받기 때문이다(따뜻한 쪽이 gel화가 어렵다). 냉난방이 잘되는 장소는 피하는 것이 좋고, 일반적으로 gel 농도는 낮은 편이 gel화가 어렵고 높을수록 굳어지기 쉽다. 따라서 3~7% 정도의 저농도 gel을 제작하는 경우에는 위 사항에 주의하면서 $(NH_4)_2SO_4$와 TEMED의 양을 10% 정도 늘려도 좋다. Stacking gel로 comb 사이에 gel이 만들어지지 않는 경우, 이 방법을 사용할 수 있다. 반대로 고농도 gel을 제작하면 유리 plate에서 기포가 들어가는 경우가 있는데, 반대로 $(NH_4)_2SO_4$와 TEMED의 양을 10% 정도 줄이도록 한다.

2. Band가 샤프하지 않거나 모양이 이상하다.

• 대부분 buffer나 시료에 문제가 있으므로 buffer의 시약의 등급이나 농도를 다시 한번 확인한다.

• Laemmli법에서 전기영동용 buffer의 pH는 별도로 조정하지 않아도 된다. 오히려 이온계열에 이상이 생겨 전기영동 결과에 영향을 미치게 된다. 원래 농축작용을 하지 않는 전기영동방법에서는 밴드가 샤프하게 되기 어려운 경우도 있으므로 문헌 등을 참조한다.

• 시료에 원인이 있는 경우에는 시료 용액 중의 염농도나 시료의 분해 등을 생각할 수 있다. 염농도가 높으면 전기영동패턴이 흐트러지는 경우도 있다. 옆 lane의 시료끼리도 서로 영향을 미치기 때문에 염농도나 양(loading volume, 단백질의 양)도 가급적 맞추는 편이 좋다.

• 시료가 분해되면 밴드가 끌리는 경우(Smear 현상)도 있다. 시료의 보관방법을 확인하고, 분해되기 쉬운 시료는 추출에서 전기영동까지 가급적 단시간에 처리하고 실험은 4℃에서 한다.

• 또 저분자량 시료나 당 단백질, 리포단백질 등은 밴드가 샤프하게 되기 어려운 경향이 있다. 그밖에 comb의 상태를 확인하고, 중합되지 않은 acrylamide 혹은 gel 조각이 남아있지 않도록 깨끗하게 세정한다.

B-B205, Woolimlions Valley II, 146-8 Sangdaewon-dong, Jungwon-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea 462-120
www.dynebio.co.kr / dyne@dynebio.co.kr / Tel : +82-2-571-1305

3. Non-Specific 밴드가 나온다.

• 시료를 loading하지 않은 lane이나 gel 전체에 밴드가 나타나는 현상은 특히 silver staining에서 많이 발생하는데, silver staining이 고농도이면서 특이성이 낮기 때문에(단백질이 아니더라도 발색된다) 일어나는 현상이다. 대부분의 경우 물이나 시약의 더러움이 원인이므로 순도가 높은 것을 사용하여 용액을 다시 제조한다.

• 그밖에 시료처리용액 중 2-mercapto-ethanol이 원인이 되는 경우도 있다. 환원제를 다른 것으로 변경하는 것도 좋은 방법이다.

4. 염색 정도가 약하다.

• 단백질의 양이 적은 경우일 수도 있고 staining 용액이 적어 나타날 수도 있다. Gel내의 SDS는 단백질 염색을 방해하므로 staining 용액으로 충분히 희석 시켜주어야 하며 염색을 2차례에 걸쳐서 실시하면 염색강도가 증가한다.

5. Destaining 후 gel이 반으로 줄어들거나 늘어난다.

• Destaining buffer의 methanol 비율이 너무 높을 경우에 gel이 쪼그라드는 현상이 나타나고, acetic acid의 비율이 높으면 gel이 커지는 현상이 발생한다.

6. References

- Takara-실험강좌(LS&B)
- 생물학연구정보센터